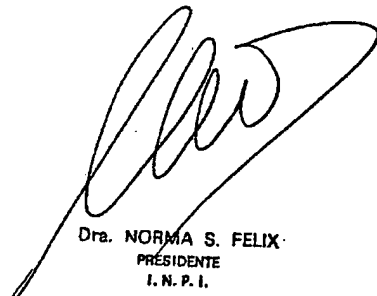


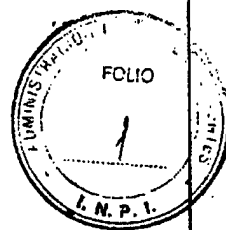


NRO. 249546

LA ADMINISTRACION NACIONAL DE PATENTES, DE CONFORMIDAD A LO RESUELTO EN EL EXPEDIENTE RESPECTIVO Y A LO DISPUESTO POR LA LEY 24.481 (T.O. 1996), EXTIENDE EN NOMBRE DE LA NACION ARGENTINA EL PRESENTE TITULO A FAVOR DE NOVO NORDISK A/S QUE ACREDITA LA CONCESION DE PATENTE DE INVENCION POR LIPASA ALCALINA., CUYA DESCRIPCION ANEXA ES COPIA DE LA QUE EXISTE DEPOSITADA EN EL INSTITUTO NACIONAL DE LA PROPIEDAD INDUSTRIAL. CONFORME LO ESTABLECIDO EN EL ART. 97 DEL DECRETO 260/96, EL TERMINO POR EL QUE SE ACUERDA LA PATENTE EXPIRARA EL DIA 21 DE MAYO DEL AÑO 2011. BUENOS AIRES, 21 DE MAYO DE 1996.

  
Dra. NORMA S. FELIX  
PRESIDENTE  
I. N. P. I.

NZAS-0024917



# Memoria Descriptiva

## de la Patente de Invención

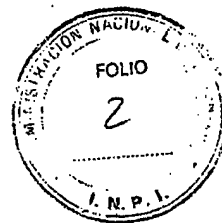
Sobre

"LIPASA ALCALINA"

Solicitada por

NOVO NORDISK A/S, residente en Novo Allé, 2880 Bags-  
vaerd, Dinamarca.

Por el plazo de QUINCE años



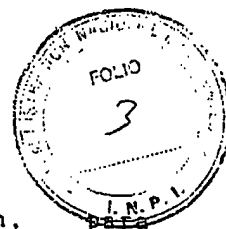
Esta invención se refiere a una nueva lipasa alcalina, no específica de posición, la cual es útil, por ejemplo, en detergentes. La invención también se refiere a un método para la producción de la nueva lipasa y a una composición detergente que comprende la nueva lipasa.

Dentro de los últimos 5 años, una lipasa microbiana derivada del hongo *Humicola lanuginosa*, ha sido introducida en muchas marcas comerciales de detergente, con el fin de mejorar la eliminación de manchas grasosas. Otras lipasas microbianas han sido también sugeridas para el uso en detergentes, por ejemplo, la lipasa bacteriana de *Pseudomonas cepacia* (Patente Norteamericana Número 4,876,024).

Muchos detergentes son alcalinos con un alto pH en solución (por ejemplo, alrededor de pH 10) y contienen un aditivo para atrapar los iones  $\text{Ca}^{++}$ . El objetivo de esta invención es proporcionar una lipasa con alta actividad a pH alto, en ausencia de  $\text{Ca}^{++}$ .

195.423

NZAS-0024919



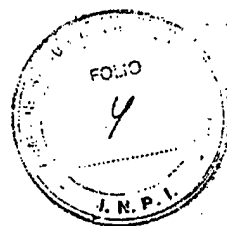
La lipasa debe ser no específica de posición, ser capaz de hidrolizar todos los enlaces éster en los triglicéridos,

Sorprendentemente, se ha encontrado que una lipasa no específica de posición, altamente alcalina, puede ser obtenida a partir de las cepas de Streptomyces, del grupo 1. No se sabía previamente que las cepas del grupo 1 de Streptomyces produjeran lipasa.

En consecuencia, en su primer aspecto, la invención proporciona una preparación de lipasa la cual:

- (1) es no específica de posición,
- (2) tiene una actividad a pH 10 que es más del 50% de la actividad al pH óptimo, cuando ambas actividades se determinan en ausencia de  $\text{Ca}^{++}$  con aceite de oliva como sustrato y alcohol polivinílico como el emulsificante, a 40 °C por 20 minutos, y
- (3) es producible mediante cultivo de una cepa de Streptomyces grupo 1.

En otro aspecto más, la invención proporciona una lipasa que:



(1) es no específica de posición,

(2) tiene actividad óptima a un pH en el rango de 9-11, cuando se determina con aceite de oliva como sustrato, y alcohol polivinílico como emulsificante, a 40 °C por 20 minutos, y

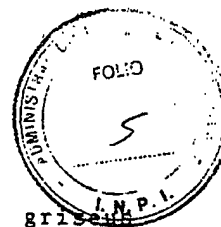
(3) es inmunológicamente idéntica a una lipasa extracelular nativa para una cepa de Streptomyces del grupo 1.

En un tercer aspecto, la invención proporciona un proceso para producir la preparación de lipasa de la invención, que comprende el cultivo de una cepa que produce lipasa de Streptomyces del grupo 1, en un medio nutritivo apropiado, que contiene fuentes de carbono y de nitrógeno, y sales inorgánicas, seguido por la recuperación de la enzima deseada.

En un aspecto adicional, la invención proporciona una composición detergente que comprende la lipasa de la invención.

La presente invención se ilustra además por referencia a los dibujos anexos, en los cuales:

Las Figuras 1-7 muestran perfiles de pH para la actividad de las preparaciones de lipasa de la in-



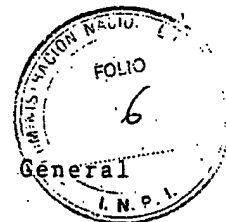
vención, derivadas de las siguientes cepas: *S. griseus* LB 501 (DSM 7349), *S. griseus* LB 502 (DSM 7350), *S. coelicolor* LB 511 (FERM BP-4236), *S. coelicolor* LB 512 (FERM BP-4237), *Streptomyces* spp. LB 524 (DSM 8672), *S. coelicolor* N 2293 (ATCC 23899) y *S. parvus* N 2300 (ATCC 12433). Los detalles adicionales se dan en el Ejemplo 6.

La Figura 8 muestra cromatogramas de Iatroscan después de la hidrólisis del aceite de oliva con una preparación de lipasa de la invención (de LB 502) y una lipasa específica de posición, de la técnica anterior (Lipolase). Los detalles adicionales se dan en el Ejemplo 8.

La Figura 9 muestra el efecto de la adición de  $\text{Ca}^{++}$  sobre la actividad de una preparación de lipasa de la invención. Los detalles adicionales se dan en el Ejemplo 11.

#### Microorganismos

La cepa microbiana usada en esta invención es una bacteria del orden Actinomycetales que pertenece a *Streptomyces* del grupo 1, como se define por



S.T. Williams y colaboradores, Journal of General Microbiology (1983), 129, 1743-1813.

Dentro de los Streptomyces del grupo 1, se prefieren los siguientes subgrupos, especies y cepas. Las variantes y mutantes de los mismos, capaces de producir la lipasa descrita anteriormente, pueden también ser usados en la invención.

| Subgrupo | Especie           | Cepa                   |
|----------|-------------------|------------------------|
| 1A       | S. albidoflavus   |                        |
|          | S. coelicolor     | ATCC 23899             |
|          |                   | FERM BP-4236           |
|          |                   | FERM BP-4237           |
|          | S. limosus        | ATCC 19778 (Cepa tipo) |
| 1B       | S. alboviridis    | ATCC 25425 (Cepa tipo) |
|          | S. griseus        | ATCC 23345 (Cepa tipo) |
|          |                   | DSM 7349               |
|          |                   | DSM 7350               |
|          | S. parvus         | ATCC 12433 (Cepa tipo) |
|          | S. setonii        | ATCC 25497 (Cepa tipo) |
| 1C       | S. nitrosporeus   | ATCC 12769 (Cepa tipo) |
|          | Streptomyces spp. | DSM 8672               |

Las cepas de la ATCC, anteriormente mencionadas, son libremente disponibles a partir de la



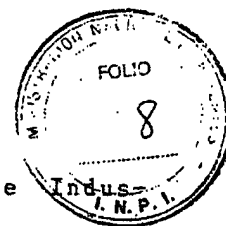
American Type Culture Collection, 12301 Parklawn  
Drive, Rockville, Maryland, USA.

Las siguientes cepas han sido depositadas por los inventores bajo los términos del Tratado de Budapest sobre el Reconocimiento Internacional de los Depósitos de Microorganismos para Fines de Procedimientos de Patente. Las cepas se clasificaron como se muestra enseguida.

| Designación taxonómica | Depósito N°  | Fecha de depósito       | Designación del depositante |
|------------------------|--------------|-------------------------|-----------------------------|
| S. griseus             | DSM 7349     | 10 de Diciembre de 1992 | LB 501                      |
| S. griseus             | DSM 7350     | 10 de Diciembre de 1992 | LB 502                      |
| S. coelicolor          | FERM BP-4236 | 10 de Marzo de 1993     | LB 511                      |
| S. coelicolor          | FERM BP-4237 | 10 de Marzo de 1993     | LB 512                      |
| Streptomyces spp.      | DSM 8672     | 2 de Noviembre de 1993  | LB 524                      |

En la presente, DSM indica un depósito realizado en Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos Celulares) (DSM), Manscheroder Weg 1b, 3300 Braunschweig, Alemania. FERM indica un depósito realizado en el Instituto Nacional de la Biociencia y la Tecnología Humana (NIBHT), Agencia de Ciencia y





Tecnología Industrial, Ministro de Comercio e Industria Internacional, 1-3, Higashi 1-chome, Tsukubashi, Ibaragi-ken 305, Japón.

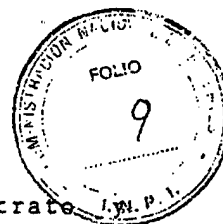
#### Especificidad de posición de la lipasa

La especificidad de posición de una lipasa puede ser verificada mediante la hidrólisis parcial de un triglicérido y el análisis de los diglicéridos formados. La lipasa de esta invención forma el 1,3-diglicérido y el 1,2-diglicérido, y es por lo tanto no específica de posición, por ejemplo, reacciona con los tres enlaces éster en un triglicérido.

#### Actividad de la lipasa a pH alcalino

La lipasa (enzima lipolítica) proporcionada por la invención es altamente alcalina. Está caracterizada por tener más del 50% (preferentemente más del 80%) de su actividad óptima a pH 10, cuando se determina en ausencia de  $\text{Ca}^{++}$  con aceite de oliva como sustrato, y alcohol polivinílico como emulsificante, a 40 °C por 20 minutos.

Alternativamente, ésta puede estar caracterizada por tener actividad óptima de 9 o más, cuando

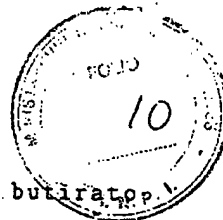


se determina con aceite de oliva como sustrato, alcohol polivinílico como emulsificante, a 40 °C por 20 minutos. Preferentemente, el pH óptimo está en el rango de 9-11, por ejemplo, a un pH de 9.5 o más, más preferentemente a un pH de 10 o más, por ejemplo, en el rango de pH 9.5 a pH 10.5.

#### Actividad de la lipasa en presencia de detergente

Las lipasas preferidas de la invención conservan alta actividad en presencia de un detergente. Estas pueden estar caracterizadas por tener una actividad en una solución detergente a pH 10.2, la cual es más del 50% de la actividad en el amortiguador al mismo pH, cuando se miden ambas actividades con aceite de oliva como sustrato a tiempo de reacción de 30 minutos y la solución detergente consiste de 0.35 gr/lt de bencen-sulfonato de alquilo lineal, 0.15 gr/lt de etoxilato de alcohol, 1.25 gr/lt de tripolifosfato de sodio, 1.00 gr/lt de sulfato de sodio, 0.45 gr/lt de carbonato de sodio y 0.15 gr/lt de metasilicato de sodio.

Alternativamente, las lipasas preferidas pueden estar caracterizadas por tener una actividad en una solución detergente a pH 7.5, la cual es al menos 75% de la actividad en el amortiguador al mismo



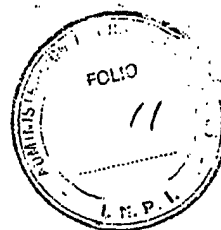
pH, cuando ambas actividades se miden con butirato de p-nitrofenilo como el sustrato, a 40 °C y 30 minutos de tiempo de reacción, el amortiguador es Tris-HCl 0.2 M, y la solución detergente es etoxilato de alcohol al 0.1% o sulfonato de alquilo lineal.

Una lipasa que tiene la actividad indicada en una solución detergente puede ser obtenida a partir de *Streptomyces* del subgrupo 1A ó 1B, por ejemplo, las especies *S. griseus*, *S. coelicolor* o *S. parvus* particularmente la cepa *S. griseus* DSM 7349, DSM 7350, *S. coelicolor* FERM BP-4236, FERM BP-4237, ATCC 23899, *S. parvus* ATCC 12433 o *Streptomyces* spp. DSM 8672.

#### Actividad de la lipasa en ausencia de $\text{Ca}^{++}$

En una modalidad particularmente preferida, la lipasa de la invención tiene una actividad en ausencia de  $\text{Ca}^{++}$  del más del 50% de la actividad a  $\text{Ca}^{++}$  50 mM, cuando ambas actividades se miden mediante el método de aceite de oliva/PVA descrito más adelante.

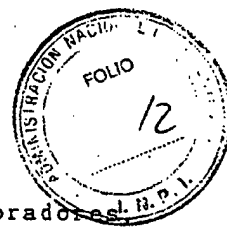
Una cepa microbiana capaz de producir una lipasa que tiene la actividad establecida en ausencia de  $\text{Ca}^{++}$ , es novedosa y es proporcionada por la invención. Una cepa preferida es *S. griseus* DSM 7350.



### Propiedades Inmunoquímicas

Las lipasas no específicas de posición, que tienen propiedades inmunológicas idénticas o parcialmente idénticas a aquellas de una lipasa extracelular nativa para una cepa de *Streptomyces* del grupo 1, y que tienen la actividad establecida a un alto pH, están dentro del alcance de la invención. Las propiedades inmunoquímicas pueden ser determinadas mediante pruebas inmunoquímicas de identidad de reacción cruzada. Las pruebas de identidad pueden ser realizadas mediante el procedimiento Ouchterlony de doble inmunodifusión, bien conocido, o mediante la inmunoelectroforesis cruzada en tandem de acuerdo a I. M. Roitt; *Immunology*, Gower Medical Publishing (1985) y N. H. Axelsen; *Handbook of Immunoprecipitation in Gel Techniques*, Blackwell Scientific Publications (1983). Capítulos 5 y 14. Los términos identidad inmunoquímica (identidad antigénica) e identidad inmunoquímica parcial (identidad antigénica parcial) se describen en Axelsen, supra, Capítulos 5, 19 y 20 y Roitt, supra, Capítulo 6.

El antisuero monoespecífico para el uso en pruebas inmunológicas puede ser producido, por ejemplo, en conejos, contra una lipasa purificada, por ejemplo, como se describe en el Capítulo 41 de N.H. Axelsen,



supra, o Capítulo 23 de N.H. Axelen y colaboradores,  
A Manual of Quantitative Immuno-electrophoresis, Blackwell  
Scientific Publications (1973).

#### Determinación de la Actividad de la Lipasa

La actividad de la lipasa es determinada usando aceite de oliva emulsificado con alcohol polivinílico como sustrato (aceite de oliva: solución de PVA al 2%; 1:3, PVA,  $n=1750 \pm 50$ ). Una mezcla de 0.1 ml de la solución de lipasa, 0.2 ml de amortiguador de dietanolamina 200 mM, y 0.2 ml de emulsión de aceite de oliva/PVA, se agita a 40 °C por 10 ó 20 minutos. La reacción se termina mediante la disminución del pH de la solución hasta aproximadamente 2-2.5, con HCl.

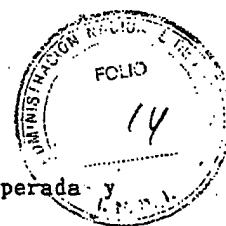
Después de la terminación, se agrega al medio de reacción 2.2 ml de una mezcla 1:1 de cloroformo y metanol, que contiene 0.091% de ácido litocólico como estándar interno, el medio es luego vigorosamente mezclado. Después de la sedimentación, la capa de solvente es eliminada y sujeta a determinación para los ácidos grasos liberados mediante análisis de TLC-FID (Iatroscan<sup>MR</sup>).



### Producción de lipasa

La lipasa de la invención se puede producir mediante el cultivo de uno de los microorganismos descritos anteriormente en un medio nutritivo apropiado, que contiene fuentes de carbono y de nitrógeno y sales inorgánicas, seguido por la recuperación de la lipasa.

La lipasa puede también ser obtenida mediante tecnología de ADN recombinante, mediante métodos conocidos en la técnica per se, por ejemplo, aislando un fragmento de ADN que codifica para la lipasa, combinando el fragmento de ADN con la señal o señales apropiadas de expresión en un vector apropiado, introduciendo el vector o partes del mismo dentro de un huésped apropiado (por ejemplo, una *Escherichia coli*, un miembro del género *Bacillus*, *Streptomyces* o *Saccharomyces*, o es un hongo filamentoso, preferentemente un miembro del género *Aspergillus*), ya sea como un plásmido de replicación autónoma o integrado dentro del cromosoma, cultivando el organismo huésped bajo condiciones que conducen a la expresión de la lipasa, y recuperando la lipasa del medio de cultivo.



Después del cultivo, la lipasa puede ser recuperada y purificada del caldo de cultivo mediante métodos convencionales, tales como cromatografía hidrofóbica, cromatografía de intercambio iónico y combinaciones de los mismos.

#### Aplicación de la lipasa

La lipasa de la invención se puede usar en aplicaciones convencionales de lipasa, particularmente a un pH alto, por ejemplo, en detergentes y en procesamiento de cuero.

La lipasa de la invención es no específica de posición (por ejemplo, es capaz de hidrolizar los tres enlaces éster en un triglicérido) y ésta puede también ser usada para la hidrólisis total de grasa y aceites. Las condiciones adecuadas pueden ser pH 7, 60 °C, ya que la lipasa es particularmente termoestable alrededor del pH neutro.

#### Composiciones de Detergente

La lipasa de la invención puede ser típicamente agregada como un componente de una composición detergente. La composición detergente puede además incluir una o más de otras enzimas tales como una proteasa, una celulasa, una peroxidasa, una oxidasa o una amilasa, convencionalmente incluídas en los aditivos para detergente. Las enzimas pueden ser incluídas en composición detergente mediante la adición de aditivos separados que contienen una o más enzimas, o mediante la adición de un aditivo combinado que comprende todas estas enzimas.



Un aditivo para detergente, de la invención, por ejemplo, un aditivo separado o un aditivo combinado, puede ser formulado, por ejemplo, como granulados, líquidos, suspensiones, etc.. Las formulaciones de aditivo para detergente, preferidas, son granulados no polvosos, líquidos, en particular líquidos estabilizados, suspensiones, o enzimas protegidas.

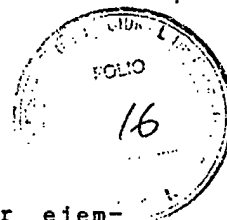
Los granulados libres de polvo pueden ser producidos, por ejemplo, como se describe en las Patentes Norteamericanas de Novo Industries A/S Nos. 4.106.991 y 4.661.452, esta última correspondiente a la Patente Argentina N° 238.333 y pueden ser opcionalmente recubiertos mediante métodos conocidos en la técnica. Las enzimas para detergente pueden ser mezcladas antes o después de la granulación.

Las preparaciones enzimáticas líquidas pueden, por ejemplo, ser estabilizadas mediante la adición de un poliol, tal como por ejemplo propilen glicol, un azúcar o un alcohol de azúcar, ácido láctico o ácido bórico, de acuerdo a métodos establecidos. Son bien conocidos en la técnica otros estabilizadores enzimáticos.

Las enzimas protegidas pueden ser preparadas de acuerdo al método descrito en la Solicitud de Patente Europea N° 238.216.

La composición detergente de la invención

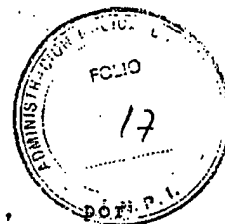




puede estar en cualquier forma conveniente, por ejemplo, como polvo, gránulos o líquido. Un detergente líquido puede ser acuoso, típicamente conteniendo hasta 90% de agua y 0 - 20% de solvente orgánico.

La composición detergente comprende un surfactante que puede ser aniónico, no iónico, catiónico, anfotérico o una mezcla de estos tipos. El detergente comprenderá usualmente 0 - 50% de surfactante aniónico tal como bencen-sulfonato de alquilo lineal (LAS), sulfonato de alfa-olefina (AOS), sulfato de alquilo (AS), etoxi-sulfato de alcohol (AES) o jabón. Esta puede también contener 0 - 40% de surfactante no iónico tal como etoxilato de nonil-fenol o etoxilato de alcohol. Además, ésta puede contener un surfactante de amida de ácido graso polihidroxílico (por ejemplo, como se describe en la Solicitud de Patente Internacional N° WO 92/06154).

El pH (medido en la solución detergente acuosa) será usualmente neutro o alcalino, por ejemplo, 7 - 11. El detergente puede contener 1 - 40% de un aditivo para detergente tal como zeolita, fosfato, fosfonato, citrato, NTA, EDTA o DTPA, anhídrido alquenil-succínico, o silicato, o éste puede ser sin aditivo (por ejemplo, esencialmente libre de un aditivo para detergente). Esta puede también contener



otros ingredientes detergentes convencionales, ejemplo, acondicionadores de tela, generadores de espuma, agentes blanqueadores, por ejemplo, perborato, percarbonato, tetraacetil-etilen-diamina (TAED), o nonanoiloxibencen-sulfonato (NOBS), agentes anticorrosión, agentes suspensores de suelo, agentes secuestradores, agentes anti-resedimentación de suelo, agentes estabilizadores para la enzima o enzimas, depresores de espuma, colorantes, bactericidas, abrillantadores ópticos o perfumes.

Las formas particulares de la composición detergente dentro del alcance de la invención incluyen:

a) Una composición detergente formulada como un polvo detergente que contiene aditivo de fosfato, surfactante aniónico, surfactante no iónico, silicato, álcali para ajustar al pH deseado en el uso, y sal inorgánica neutra.

b) Una composición detergente formulada como un polvo detergente que contiene aditivo de zeolita, surfactante aniónico, surfactante no iónico, polímero acrílico o equivalente, silicato, álcali para ajustar al pH deseado en el uso, y sal inorgánica neutra.

c) Una composición detergente formulada como un líquido detergente acuoso que comprende surfactante



aniónico, surfactante no iónico, humectante, ácida orgánico, álcali cáustico, con un pH en el uso, ajustado a un valor entre 7 y 10.5.

d) Una composición detergente formulada como un líquido detergente no acuoso que comprende un surfactante no iónico líquido, que consiste esencialmente de alcohol primario alcoxilado, lineal, aditivo de fosfato, álcali cáustico, con un pH en el uso ajustado a un valor entre aproximadamente 7 y 10.5.

e) Una composición detergente formulada como un polvo detergente en la forma de un granulado que tiene una densidad aparente de al menos 600 gr/lt, que contiene surfactante aniónico y surfactante no iónico, baja o substancialmente cero sal inorgánica neutra, aditivo de fosfato, y silicato de sodio.

f) Una composición detergente formulada como un polvo detergente en la forma de un granulado que tiene una densidad aparente de al menos 600 gr/lt, que contiene surfactante aniónico y surfactante no iónico, baja o substancialmente cero sal inorgánica neutra, aditivo de zeolita, y silicato de sodio.

g) Una composición detergente formulada como un polvo detergente que contiene surfactante aniónico, surfactante no iónico, polímero acrílico, jabón de ácido graso, carbonato de sodio, sulfato de sodio,



partículas de arcilla, y silicato de sodio.

h) Un detergente compacto líquido que comprende 5 - 65% en peso de un surfactante, 0 - 50% en peso de aditivo y 0 - 30% en peso de electrólito.

Se contempla actualmente que, en la composición detergente de la invención, la enzima de la invención puede ser agregada en una cantidad que corresponde a 0.001 - 100 mg de enzima por litro de licor de lavado.

#### EJEMPLOS

Los siguientes ejemplos ilustran adicionalmente la presente invención, y no se pretende que sean de ningún modo limitantes del alcance de la invención, como es reclamada.

#### EJEMPLO 1

##### Producción de lipasa

Cultivos de siembra se produjeron en matraces de agitación, a partir de cada una de las cepas LB 501 (DSM 7349), LB 502 (DSM 7350), LB 511 (FERM BP-4236), y LB 512 (FERM BP-4237), respectivamente, en un medio de Waksman de la siguiente composición



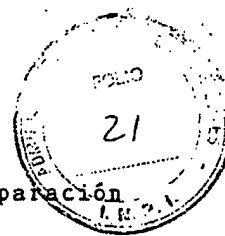
(gr/litro):

|                   |    |
|-------------------|----|
| Glucosa           | 10 |
| Peptona           | 5  |
| Extracto de carne | 5  |
| NaCl              | 5  |
| pH ajustado a 6.5 |    |

Después de dos días a 30°C y 230 ppm, se inocularon 5 ml del cultivo de siembra en matraces de agitación que contenían 100 ml del siguiente medio (gr/litro):

|   |        |
|---|--------|
| Pharmamedia <sup>MR</sup> (suministrado por Traders Protein, The Procter & Gamble Oilseed Products Co.) | 20 gr  |
| Polvo de infusión de maíz   | 10 gr  |
| Glicerol  | 10 gr  |
| K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>   | 1 gr   |
| MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O  | 0.5 gr |
| Ajuste de pH a 7.0 antes de esterilizar en autoclave.   |        |
| Esterilización en autoclave 20 min/121°C.   |        |

Se agregó 1 ml de aceite de jojoba a cada matraz de agitación, y los matraces se cultivaron a 27°C por 4 días a 230 rpm.



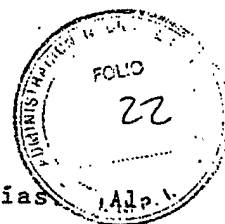
El caldo de cultivo se sujetó a separación líquido/sólido mediante centrifugación. El sobrenadante se secó por congelamiento, y se obtuvo una preparación de polvo crudo.

## EJEMPLO 2

### Producción de lipasa

Como se indica en seguida, se cultivaron cepas en matraces de agitación de 250 ml que contenían 100 ml de medios de cultivo denotados como ACT-1, ACT-2, ACT-3, ACT-4 y ACT-5, teniendo la siguiente composición (ml/SF indica ml por matraz de agitación):

|                                       | ACT-1 | ACT-2 | ACT-3 | ACT-4 | ACT-5 |
|---------------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Pharmamedia (g/l)                     | 20    | 20    | 20    | 20    | 20    |
| C.S.P. (g/l)                          | 10    | 10    | 10    |       | 10    |
| Amina N.Z. (g/l)                      |       |       |       | 10    |       |
| Glicerol (G/l)                        | 10    | 10    | 10    | 10    | 10    |
| MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O  | 0.5   | 0.5   | 0.5   | 0.5   | 0.5   |
| K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (g/l) | 1     | 1     | 1     | 1     | 1     |
| Aceite de jojoba (ml/SF)              | 1     |       | 1     | 1     | 2     |
| Aceite de soya (ml/SF)                |       | 2     |       |       |       |
| Ajustar a pH                          | 6.0   | 6.5   | 6.5   | 6.0   | 6.0   |



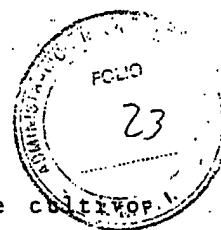
Cada cepa se cultivó a 27°C por 4 días final del cultivo, se midieron el pH y la actividad de la lipasa (LU) del caldo de cultivo. Una Unidad de Lipasa (LU) es la cantidad de enzima la cual, bajo condiciones estándares (por ejemplo a 30°C; pH 7.0; y substrato de tributirina) libera un micromol de ácido butírico titulable, por minuto. Resultados:

| Especie                  | Cepa       | Medio de cultivo | pH después del cultivo | LU/ml |
|--------------------------|------------|------------------|------------------------|-------|
| <i>S. griseus</i>        | LB 501     | ACT-1            | 8.1                    | 8.0   |
| <i>S. griseus</i>        | LB 502     | ACT-2            | 8.3                    | 3.0   |
| <i>S. coelicolor</i>     | LB 511     | ACT-5            | 8.7                    | 6.5   |
| <i>S. coelicolor</i>     | LB 512     | ACT-3            | 8.2                    | 6.4   |
| <i>Streptomyces</i> spp. | LB 524     | ACT-1            | 8.3                    | 3.5   |
| <i>S. coelicolor</i>     | ATCC 23899 | ACT-1            | 8.6                    | 4.5   |
| <i>S. parvus</i>         | ATCC 12433 | ACT-1            | 8.4                    | 3.1   |

### EJEMPLO 3

#### Producción de lipasa

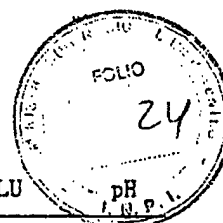
Como se indica en seguida, se cultivaron cepas en matraces de agitación que contenían medio de cultivo ACT-1 (descrito en el Ejemplo 2) a 27°C.



El pH y la actividad de la lipasa del caldo de cultivo se midieron después de 3, 4 y 5 días. Los resultados fueron como sigue:

| Especie        | Cepa              | Día | Actividad LU       | pH  |
|----------------|-------------------|-----|--------------------|-----|
| S. griseus     | LB 502 (DSM 7350) | 3   | 10.6               | 8.3 |
|                |                   | 4   | 10                 | 8.7 |
|                |                   | 5   | 10                 | 8.9 |
| S. coelicolor  | ATCC 23899        | 3   | 5.2                | 6.8 |
|                |                   | 4   | 6.1                | 8.0 |
|                |                   | 5   | 2.6                | 8.6 |
| S. limosus     | ATCC 19778        | 3   | 0.6                | 7.1 |
|                |                   | 4   | 1.5                | 7.1 |
|                |                   | 5   | 2.2                | 7.5 |
| S. albobiridis | ATCC 25425        | 3   | 1.8                | 8.1 |
|                |                   | 4   | 4.6                | 8.4 |
|                |                   | 5   | 5.2                | 8.8 |
| S. griseus     | ATCC 23345        | 3   | 2.1                | 7.9 |
|                |                   | 4   | 2.9                | 8.1 |
|                |                   | 5   | <del>2.9</del> 2.6 | 8.1 |
| S. parvus      | ATCC 12433        | 4   | 0.6                | 8.1 |
|                |                   | 5   | 1.2                | 8.2 |





| Especie         | Cepa       | Día | Actividad LU |     |
|-----------------|------------|-----|--------------|-----|
| S. setonii      | ATCC 25497 | 3   | 35           | 7.6 |
|                 |            | 4   | 56           | 7.9 |
|                 |            | 5   | 72           | 8.3 |
| S. nitrosporeus | ATCC 12769 | 3   | 0.5          | 7.4 |
|                 |            | 4   | 0.2          | 7.9 |
|                 |            | 5   | 0.7          | 8.0 |

#### EJEMPLO 4

#### Producción de lipasa a partir de S. griseus LB 502 (DSM 7350)

Se cultivó la cepa a 27°C en matraces de agitación, en un medio que tiene la siguiente composición:

|                                      |                          |
|--------------------------------------|--------------------------|
| Pharmamedia                          | 20 g/l                   |
| Polvo de infusión de maíz            | 6.64 g/l                 |
| Glicerol                             | 10 g/l                   |
| K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>      | 1 g/l                    |
| MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O | 0.5 g/l                  |
| Aceite de jojoba                     | 1 ml/matraz de agitación |
| pH ajustado a                        | 6.0                      |



Después de 4 días, el rendimiento fue de aproximadamente 30 LU/ml.

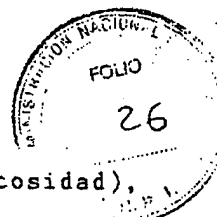
#### EJEMPLO 5

##### Purificación de la lipasa

La lipasa cruda proveniente de *S. griseus* LB 501 (DSM 7349) se purificó mediante cromatografía hidrofóbica seguida por cromatografía de intercambio iónico, como sigue.

Cromatografía hidrofóbica: El polvo de lipasa cruda, preparado en el Ejemplo 1, se disolvió y se ajustó a  $\text{CH}_3\text{COONH}_4$  3.5 M. Este se aplicó a una columna de t-Butil Macropep HIC (producto de Biorad), y la columna se lavó con la misma concentración de  $\text{CH}_3\text{COONH}_4$  para eliminar la mayor parte del color y de la proteína. En seguida se comenzó un gradiente, primero rápidamente hasta 1 M, luego lentamente hasta 0 M. Se observaron dos picos en el cromatograma, y en consecuencia se recolectaron dos combinaciones de lipasa. La recuperación total de la actividad de lipasa fue mayor del 80%.

Cromatografía de intercambio iónico: Después de concentrar y desionizar mediante ultrafiltración



(recuperación de 60 - 70%, debido a la alta viscosidad), cada combinación se aplicó a una columna de DEAE-Toyopearl. Se observó un pico amplio que contenía la actividad de la lipasa en el cromatograma, y se recolectó. Se eliminó algo del color, y la recuperación de la actividad de la lipasa fue mayor del 80%. Finalmente, cada combinación se ultrafiltró otra vez (recuperación mayor del 80%).

El material inicial tuvo una actividad de lipasa, total, de 16,500 LU. Las combinaciones 1 y 2 tuvieron actividades de lipasa específicas de 74.4 LU/mg de proteína y 43.3 LU/mg de proteína, y actividades de lipasa total de 3350 LU y 1860 LU, respectivamente. De este modo, la recuperación total de la actividad de la lipasa fue de 32%.

Se encontró que ambas combinaciones contenían al menos dos lipasas que tienen puntos isoelectricos (mediante enfoque isoelectrico) de 5.5 o menos, y pesos moleculares entre 28 y 43 kD.

#### EJEMPLO 6

Curvas de la actividad de pH de las preparaciones de lipasa

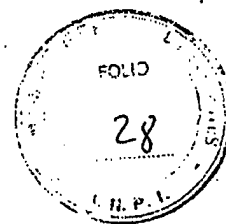


Se determinaron los perfiles de pH para las preparaciones de lipasa a partir de las siguientes cepas:

- S. griseus LB 501 (DSM 7349)
- S. griseus LB 502 (DSM 7350)
- S. coelicolor LB 511 (FERM BP-4236)
- S. coelicolor LB 512 (FERM BP-4237)
- Streptomyces spp. LB 524 (DMS 8672)
- S. coelicolor N 2293 (ATCC 23899)
- S. parvus N 2300 (ATCC 12433)

Los perfiles de pH de las preparaciones de lipasa se determinaron en ausencia de  $\text{Ca}^{++}$  a 40°C con aceite de oliva como sustrato, y PVA como emulsificante a tiempo de reacción de 20 minutos, usando amortiguador de glicina a pH 8.5 - 10.5. Los resultados se presentan en las Figuras 1 - 7 como actividad relativa (% rel.) contra el pH.

Se observa que las lipasas tienen actividad óptima en ausencia de  $\text{Ca}^{++}$  aproximadamente a pH 9 - 10, y que éstas tienen más de 50% de la actividad óptima a pH 10.



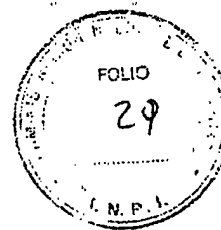
EJEMPLO 7

Actividad de la lipasa a pH alcalino

Se probaron preparaciones de lipasa para la actividad de la lipasa a pH 6 - 10, mediante una técnica de placa de difusión.

Se probaron las preparaciones de lipasa obtenidas después de 3 y 4 días de cultivo en el Ejemplo 3. Las placas de difusión se prepararon como se describe en el Ejemplo 11 de WO 88/02775 con un medio de prueba que contiene aceite de oliva y PVA a pH 6, 8.5 y 10, respectivamente, y se determinó la presencia o ausencia de la actividad de la lipasa al pH del medio, a partir de la apariencia de una zona de claridad.

Los resultados mostraron que todas las preparaciones de lipasa del Ejemplo 3 presentaron actividad a pH 6, 8.5 y 10, por ejemplo, éstas son todas activas a pH alto hasta pH 10.



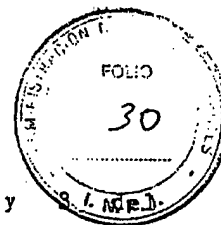
### EJEMPLO 8

#### Especificidad de posición

La especificidad de posición se determinó mediante la hidrólisis de triglicérido y el análisis de los diglicéridos formados con una preparación de lipasa de la invención.

Una preparación de lipasa de *S. griseus* LB 502 (DSM 7350) se usó para hidrolizar el aceite de oliva como substrato, con PVA como emulsificante a pH 10 en amortiguador de glicina por 30 minutos a pH 10, después de lo cual los productos de la hidrólisis se analizaron mediante Iatroscan. Se usó para comparación Lipolase, una preparación de lipasa específica de posición, de la técnica anterior, derivada de *Humicola lanuginosa*.

Los resultados se muestran en la Figura 8. Se observa que, con la preparación de lipasa de la invención, se formó más 1,3-diglicérido que 1,2-diglicérido, indicando que la preparación es no específica de posición, con más alta actividad en la posición 2 que en las posiciones 1 y 3 del triglicérido. Lipolase casi no dió formación de 1,3-diglicérido, confirmando que es específico de posición, por ejemplo



reacciona únicamente en las posiciones 1 y triglicérido.

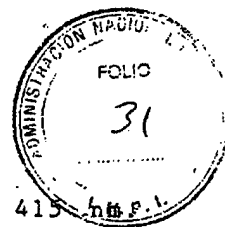
Las preparaciones de lipasa de la invención a partir de *Streptomyces* spp. LB 524 (DSM 8672), *S. coelicolor* N 2293 (ATCC 23899) y *S. parvus* N 2300 (ATCC 12433) produjeron resultados similares como LB 502.

#### EJEMPLO 9

##### Efecto del detergente sobre la actividad de la lipasa

La actividad de la lipasa de diversas preparaciones de lipasa se midió en presencia de 0.1% de un surfactante no iónico o aniónico (etoxilato de alcohol o bencen-sulfonato de alquilo lineal) a pH 7.5, y se comparó con un control sin detergente.

Se usaron las preparaciones de lipasa del Ejemplo 2. En cada prueba, se mezcló 0.1 ml de solución de lipasa con 0.4 ml de una solución 0.4 mM de butirato de p-nitrofenilo en Tris-HCl 0.2 M (pH 7.5) y 0.5 ml de una solución detergente al 0.2%. Se realizó un control con agua en vez de con solución detergente. La mezcla se incubó a 40°C por 30 minutos, y se determinó el grado de hidrólisis



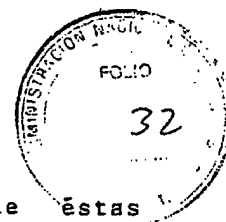
mediante la medición de la densidad óptica a 415 mμ.

Los resultados se expresan como la actividad relativa en presencia de detergente, en comparación al control.

| Especie                  | Cepa                     | Actividad relativa en el detergente |                                   |
|--------------------------|--------------------------|-------------------------------------|-----------------------------------|
|                          |                          | Etoxilato de alcohol                | Sulfonato de alquilbenceno lineal |
| <i>S. griseus</i>        | LB 501 (DSM 7349)        | 55 %                                | 75 %                              |
| <i>S. griseus</i>        | LB 502 (DSM 7350)        | >100 %                              | >100 %                            |
| <i>S. coelicolor</i>     | LB 511<br>(FERM BP-4236) | 100 %                               | 21 %                              |
| <i>S. coelicolor</i>     | LB 512<br>(FERM BP-4237) | 87 %                                | 50 %                              |
| <i>Streptomyces</i> spp. | LB 524 (DSM 8672)        | 100 %                               | 97 %                              |
| <i>S. coelicolor</i>     | ATCC 23899               | 95 %                                | 75 %                              |
| <i>S. parvus</i>         | ATCC 12433               | 97 %                                | >100 %                            |

Se observa que en presencia de etoxilato de alcohol, todas las preparaciones de lipasa conservan más del 50% de su actividad, la mayoría conservan más del 75%, y algunas conservan más del 90%. En presencia de bencen-sulfonato de alquilo lineal, la mayoría de las preparaciones de lipasa conservan al





menos 50% de su actividad, la mayoría de éstas conservan al menos 75%, y algunas conservan más del 90%.

#### EJEMPLO 10

##### Actividad de lipasa en el detergente

La actividad de lipasa de varias preparaciones de lipasa se midió en una solución de un detergente con aditivo, a pH alto, y se comparó con un control sin detergente.

En cada prueba, la preparación de lipasa se agregó a una solución detergente de la siguiente composición (indicado como material activo). La mezcla se incubó con aceite de oliva como sustrato y PVA como emulsificante a 40°C por 30 minutos, después de esto se determinó la cantidad de ácido graso libre formado. Se realizó un control con glicina o amortiguador de dietanol al mismo pH en vez de la solución detergente.

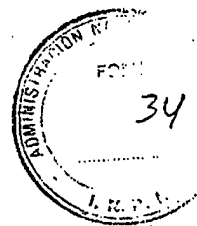


|   |          |
|---|----------|
| Bencen-sulfonato de alquilo lineal (Nansa 1169/P) | 0.35 g/l |
| Etoxilato de alcohol (Dobanol 25-7)               | 0.15 g/l |
| Tripolifosfato de sodio (STPP)                    | 1.25 g/l |
| Sulfato de sodio                                  | 1.00 g/l |
| Carbonato de sodio                                | 0.45 g/l |
| Metasilicato de sodio                             | 0.15 g/l |
| pH  | 10.2     |

Los resultados se expresan como actividad relativa en presencia de detergente, en comparación al control.

| Especie                  | Cepa              | Actividad relativa en la solución detergente |
|--------------------------|-------------------|--|
| <i>S. griseus</i>        | LB 502 (DSM 7350) | 67 %   |
| <i>Streptomyces</i> spp. | LB 524 (DSM 8672) | 76 %   |
| <i>S. coelicolor</i>     | ATCC 23899        | 96 %   |
| <i>S. parvus</i>         | ATCC 12433        | 73 %   |

Se observa que las preparaciones anteriores de lipasa tienen una actividad relativa de más del 50% en la solución detergente, en comparación al control.



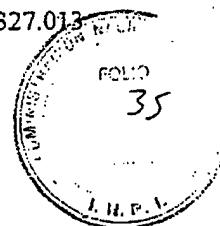
### EJEMPLO 11

#### Efecto del $\text{Ca}^{++}$ sobre la actividad de la lipasa

Se midió la actividad de una preparación de lipasa de la invención sin la adición de  $\text{Ca}^{++}$  y con adición de diversas cantidades de  $\text{Ca}^{++}$ .

Una preparación de lipasa proveniente de *S. griseus* LB 502 (DSM 7350) se incubó con aceite de olivo como sustrato y PVA como emulsificante, a 40°C por 30 minutos, en un amortiguador de dietanolamina a pH 10, después de lo cual se determinó el grado de hidrólisis. El experimento se repitió con la adición de una sal de calcio en diversas concentraciones.

Los resultados se muestran en la Figura 9. Se observa que la actividad de la lipasa de esta preparación no disminuye cuando se disminuye la concentración de  $\text{Ca}^{++}$ .



### REIVINDICACIONES

Habiendo así especialmente descripto y determinado la naturaleza de la presente invención y la forma como la misma ha de ser llevada a la práctica se declara reivindicar como de propiedad y derecho exclusivo:

1. Una lipasa, caracterizada porque:

(1) es no específica de posición,

(2) tiene una actividad a pH 10 que es mayor del 50% de la actividad al pH óptimo, cuando ambas actividades se determinan en ausencia de  $\text{Ca}^{++}$  con aceite de oliva como sustrato y alcohol polivinílico como emulsificante, a 40°C por 20 minutos, y

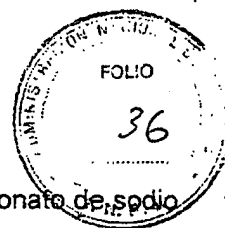
(3) es producible mediante el cultivo de una cepa de *Streptomyces* del grupo 1.

2. La lipasa de conformidad con la reivindicación 1, caracterizada porque la cepa es *S. coelicolor*, *S. limosus*, *S. albobiridis*, *S. griseus*, *S. parvus*, *S. setonii*, *S. nitrosporeus* o *Streptomyces* spp. DSM 8672.

3. La lipasa de conformidad con la reivindicación 2, caracterizada porque la cepa es *S. coelicolor* FERM BP-4236, FERM BP-4237, ATCC 23899, *S. limosus* ATCC 19778, *S. albobiridis* ATCC 25425, *S. griseus* ATCC 23345, DSM 7349, DSM 7350, *S. parvus* ATCC 12433, *S. setonii* ATCC 25497 ó *S. nitrosporeus* ATCC 27472.

4. La lipasa de conformidad con la reivindicación 1, caracterizada porque tiene una actividad en una solución detergente a pH 10.2, que es mayor del 50% de la actividad en un amortiguador a pH 10, cuando ambas actividades se miden con aceite de oliva como sustrato y alcohol polivinílico como emulsificante, a un tiempo de reacción de 30 minutos, y la solución detergente consiste de 0,35 g/lit de bencen-sulfonato de alquilo lineal, 0,15 g/lit de etoxilato de alcohol, 1,25 g/lit de

US:195.423  
eng.



tripolifosfato de sodio 1,00 g/lit de sulfato de sodio, 0,45 g/lit de carbonato de sodio y 0,15 g/lit de metasilicato de sodio.

5. La lipasa de conformidad con la reivindicación 4, caracterizada porque la cepa es una cepa *Streptomyces* subgrupo 1 A ó 1 B.

6. La lipasa de conformidad con la reivindicación 5, caracterizada porque la cepa es *S. griseus*, *S. coelicolor* ó *S. parvus* ó *Streptomyces* spp. DSM 8672.

7. La lipasa de conformidad con la reivindicación 6, caracterizada porque la cepa es *S. griseus* DSM 7349, DSM 7350, *S. coelicolor* FERM BP-4236, FERM BP-4237, ATCC 23899 ó *S. parvus* ATCC 12433.

8. La lipasa de conformidad con la reivindicación 4, caracterizada porque tiene una actividad en ausencia de  $\text{Ca}^{++}$  que es mayor de 50% de la actividad a  $\text{Ca}^{++}$  50 mM, cuando ambas actividades se miden con aceite de oliva como sustrato y alcohol polivinílico como emulsificante, a pH 10.

9. La lipasa de conformidad con la reivindicación 8, caracterizada porque la cepa es *S. griseus* DSM 7350.

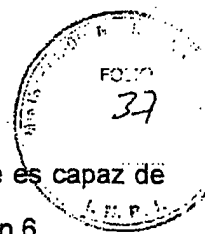
10. La lipasa de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizada porque se proporciona como un aditivo para detergente en la forma de un granulado no polvoso, un líquido estabilizado, una suspensión, o una enzima protegida:

11. Una lipasa, caracterizada porque:

(1) es no específica de posición,

(2) tiene actividad óptima a un pH en el rango de 9-11, cuando se determina con aceite de oliva como sustrato y alcohol polivinílico como el emulsificante, a 40°C por 20 minutos, y

(3) es inmunológicamente idéntica o parcialmente idéntica con una lipasa extracelular nativa para una cepa de *Streptomyces* del grupo 1.



12. Una cepa de *Streptomyces griseus*, caracterizada porque es capaz de producir la preparación de lipasa de conformidad con la reivindicación 6.

13. La cepa de conformidad con la reivindicación 12, caracterizada porque es *S. griseus* DSM 7350 o un mutante o variante de la misma, capaz de producir la preparación de lipasa.

14. Un proceso para la producción de una preparación de lipasa de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, caracterizado por el proceso porque comprende el cultivo de una cepa de *Streptomyces* del grupo 1 que produce lipasa, en un medio nutritivo apropiado, que contiene fuentes de carbono y de nitrógeno y sales inorgánicas, seguido por la recuperación de la preparación de lipasa.

15. El proceso de conformidad con la reivindicación 14, caracterizado porque la cepa es *S. coelicolor*, *S. limosus*, *S. albobiridis*, *S. griseus*, *S. parvus*, *S. setonii*, *S. nitrosporeus* o *Streptomyces* spp. DSM 8672.

16. El proceso de conformidad con la reivindicación 15, caracterizado porque la cepa es *S. coelicolor* FERM BP-4236, FERM BP-4237, ATCC 23899, *S. limosus* ATCC 19778, *S. albobiridis* ATCC 25425, *S. griseus* ATCC 23345, DSM 7349, DSM 7350, *S. parvus* ATCC 12433, *S. setonii* ATCC 25497 o *S. nitrosporeus* ATCC 27472 o una variante o mutante de las mismas, que produce lipasa.

17. Una composición detergente, caracterizada porque comprende un surfactante y la preparación de lipasa de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10.

18. La composición detergente de conformidad con la reivindicación 17, caracterizada además porque comprende 1-40 % de un aditivo para detergente, y la cual tiene un pH de 7-11, medido en una solución acuosa.

19. La composición detergente de conformidad con la reivindicación 18,



caracterizada porque el aditivo es un aditivo de fosfato o una zeolita.

p. NOVO-NORDISK A/S.

*Carlos A. Alonso*

**CARLOS A. ALONSO**

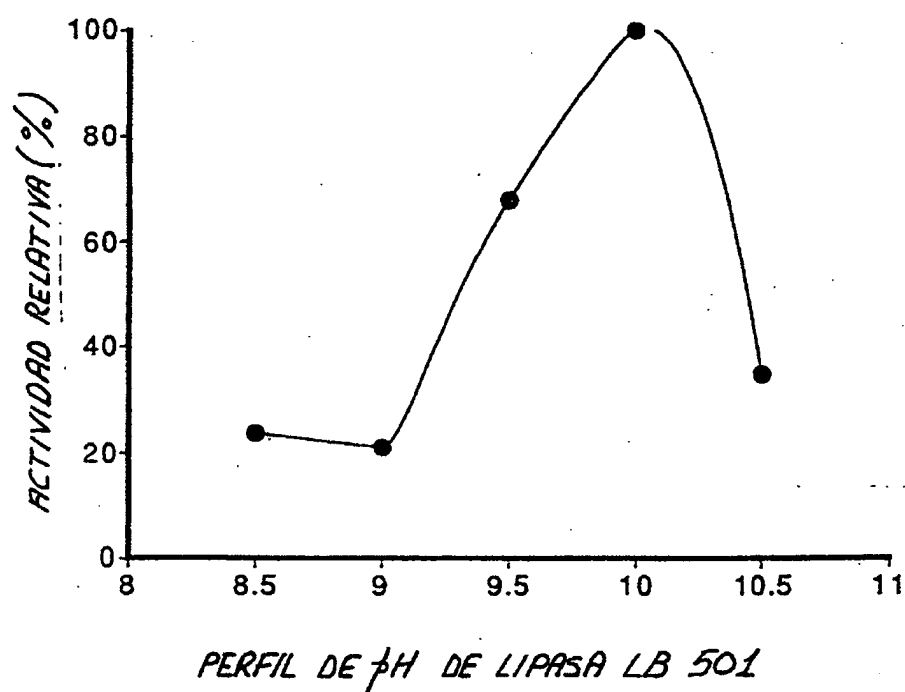
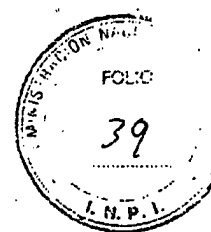


Fig. 1



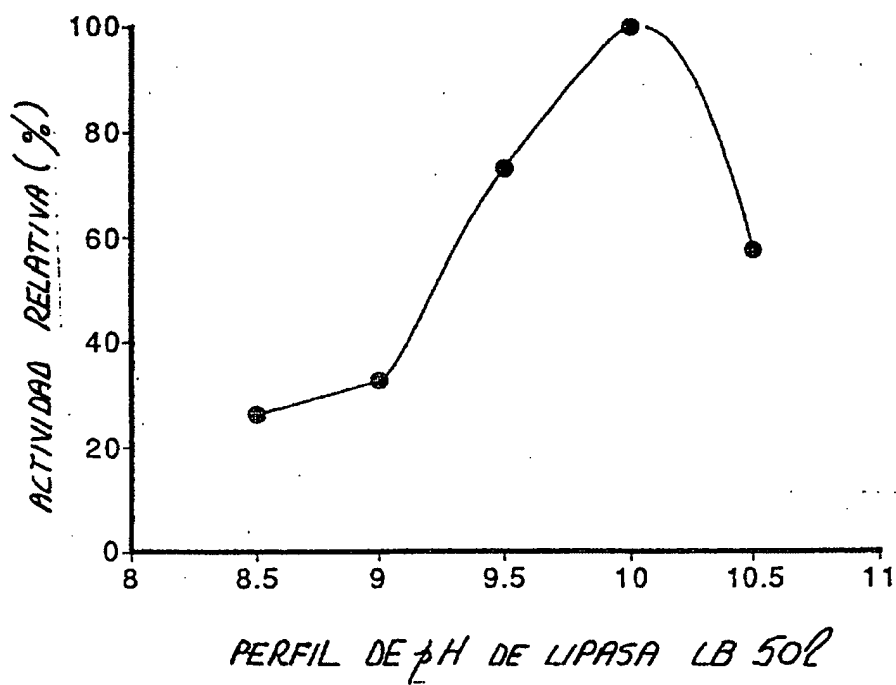
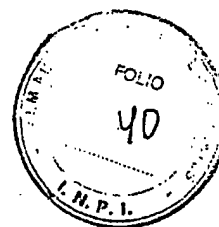


Fig. 2

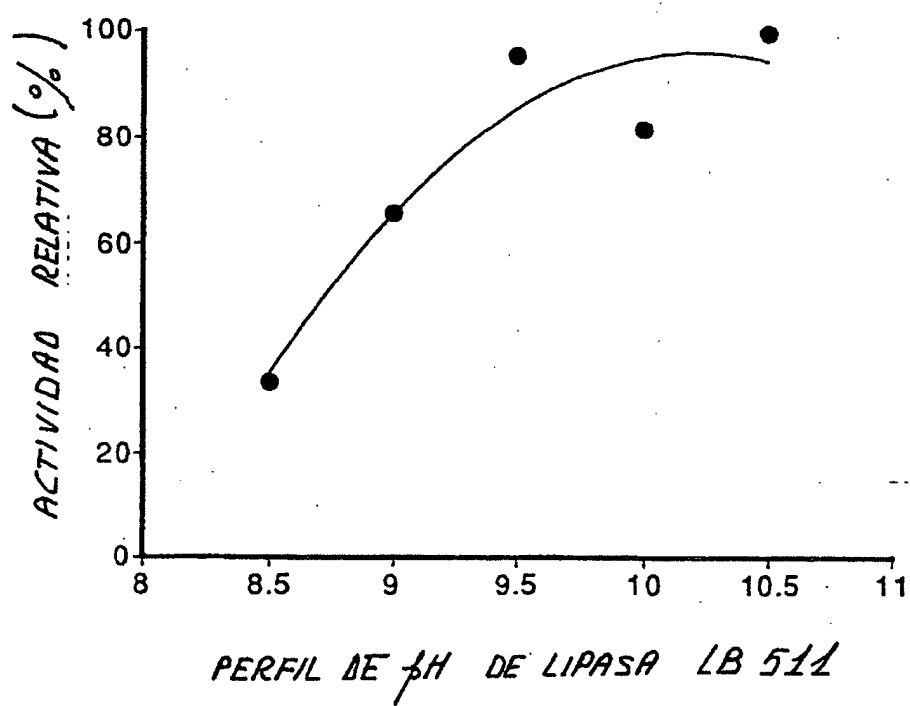
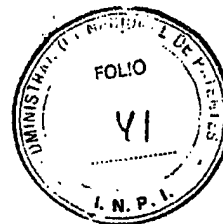
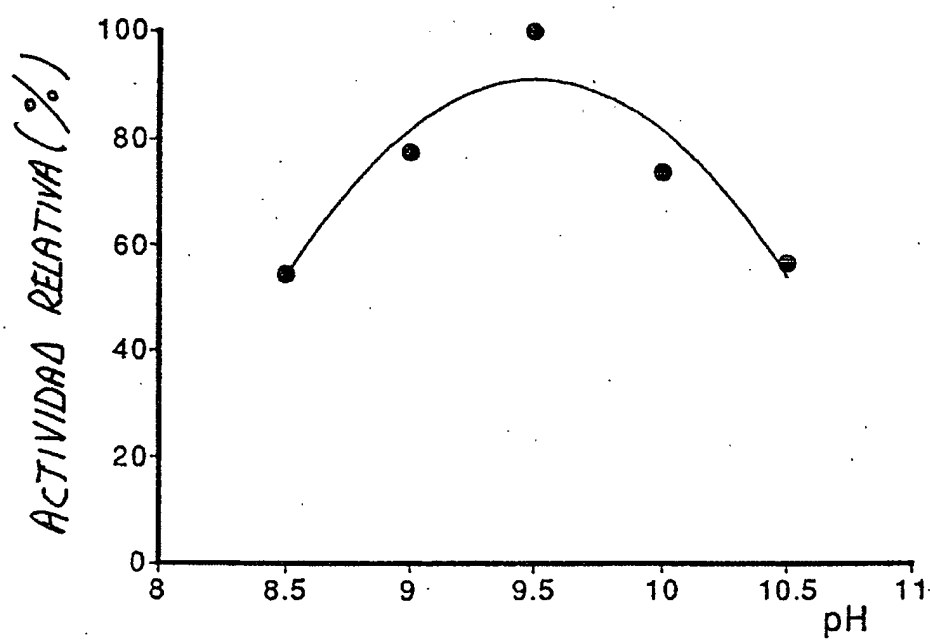
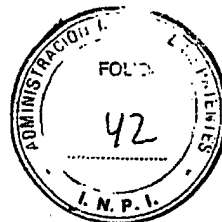
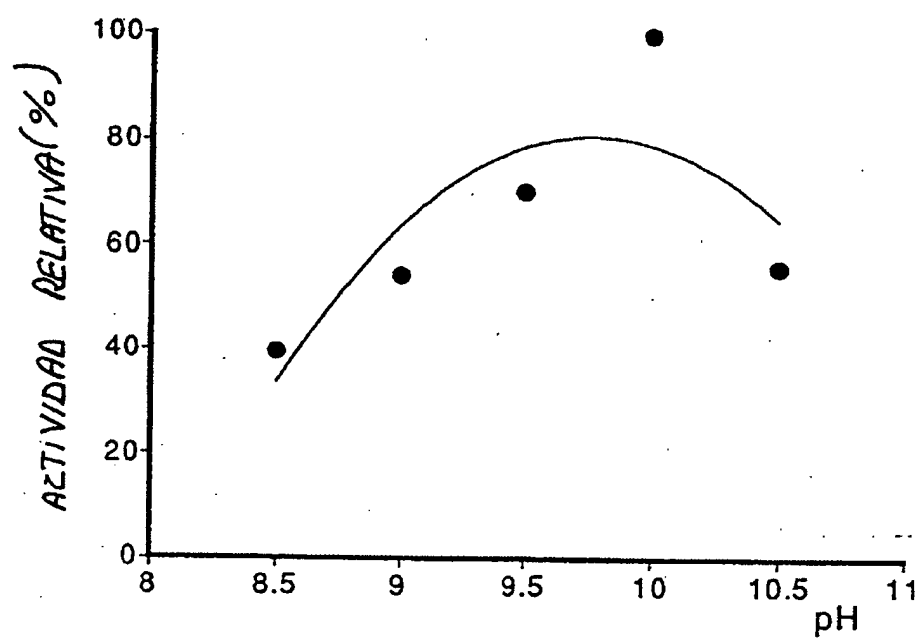
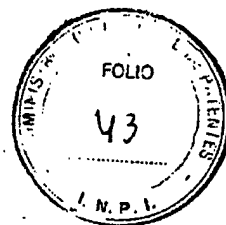


Fig. 3



PERFIL DE  $pH$  DE LIPASA LB 511

Fig. 4



PERFIL DE pH DE LIPASA LB 524.

Fig. 5

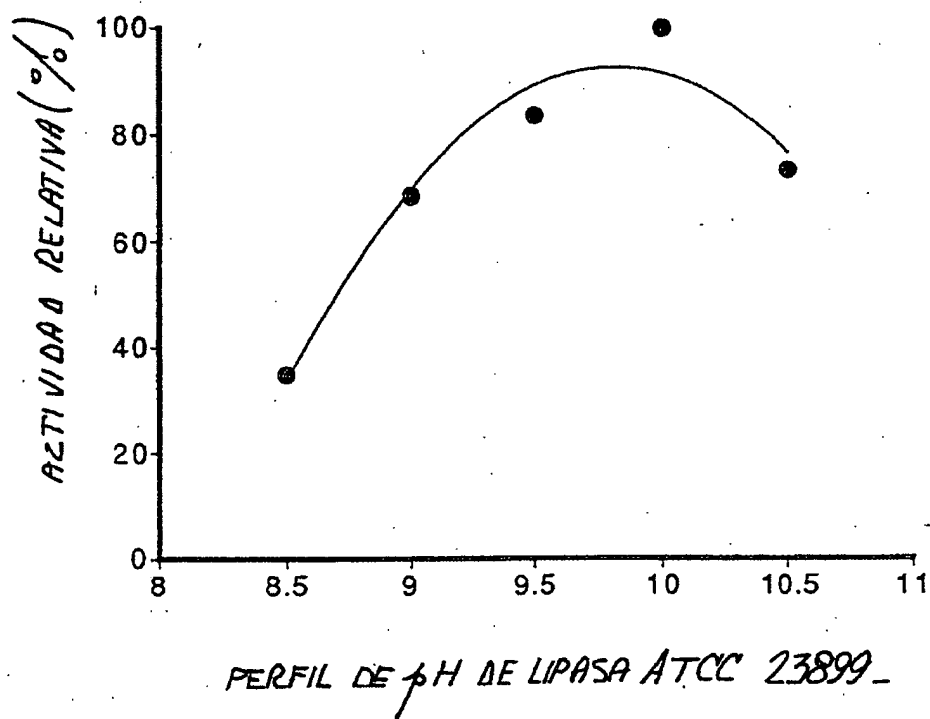
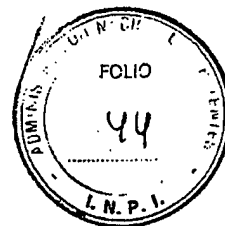
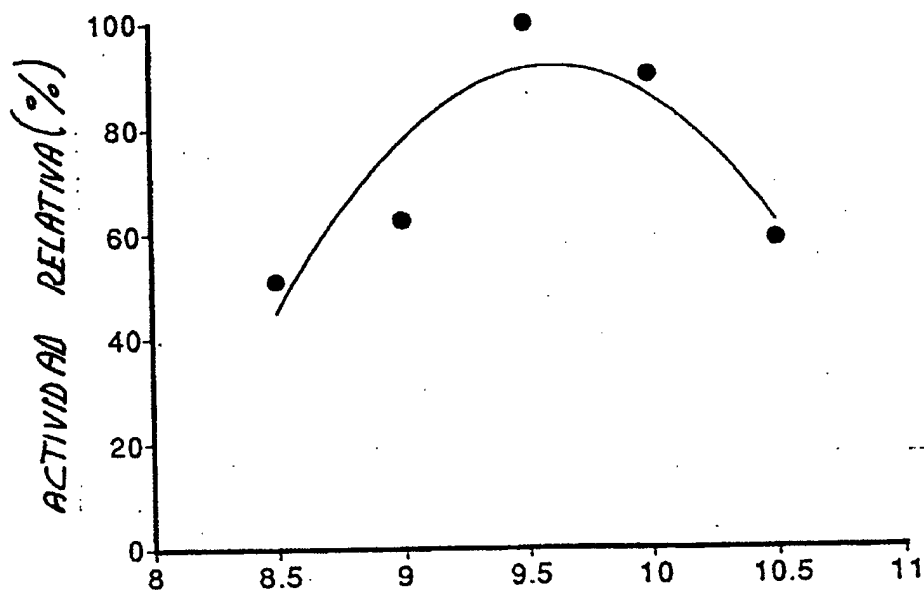
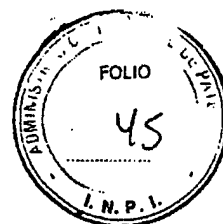


Fig. 6



PERFIL DE H DE LIPASA ATIC 12433..

Fig. 7

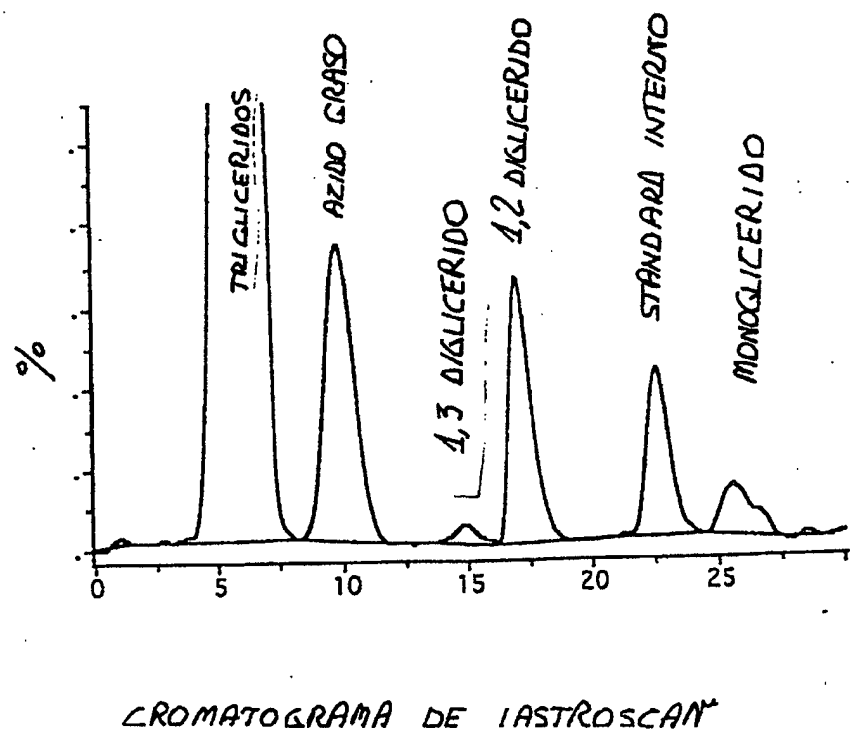
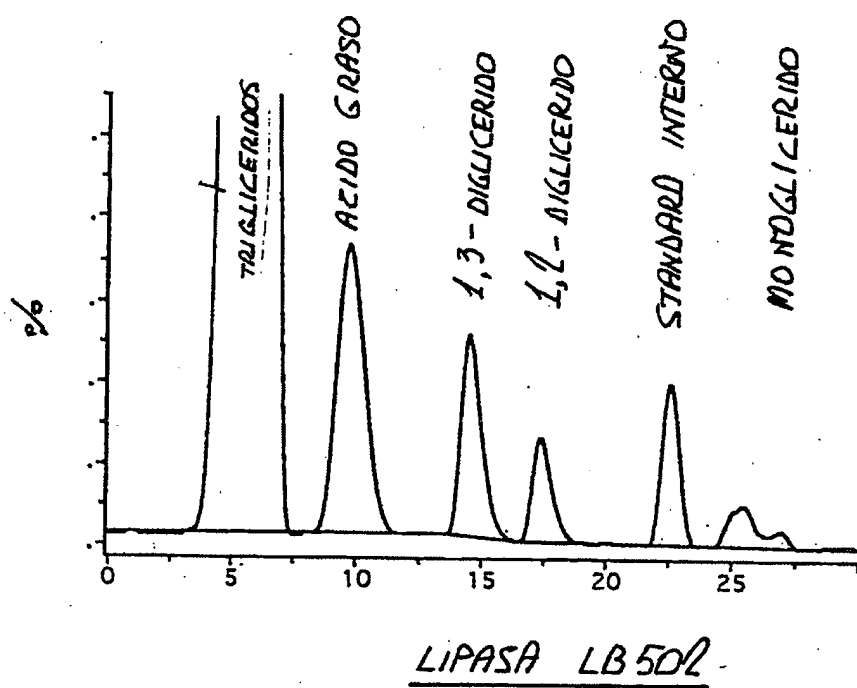
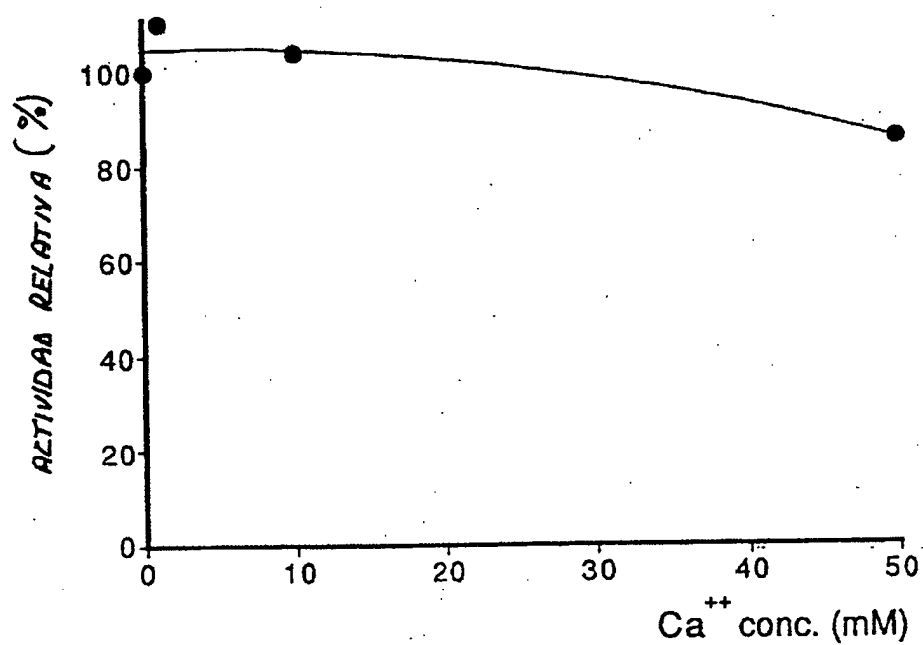
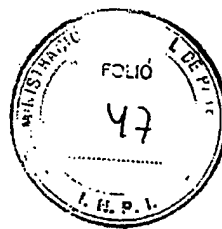


Fig. 8



EL EFECTO DE CA SOBRE LIPASA LB 502

Fig. 9



REPUBLICA



ARGENTINA

INSTITUTO NACIONAL  
DE LA  
PROPIEDAD INDUSTRIAL

(10) PATENTE DE INVENCION  
(11) RESOLUCION NRO. 249546  
(24) FECHA DE RESOLUCION 21/05/96  
(-- ) FECHA DE VENCIMIENTO 21/05/2011  
(21) ACTA NRO. 327013  
(22) FECHA PRESENTACION 22/12/93  
(51) INT. CL. 6 - C12N 9/20, C11D 3/386 // (C12N 9/20, C12R 1/465)  
(30) PRIORIDAD CONVENIO DE PARIS  
(31) 1529/92 22/12/92 DK  
(32) 96/93 28/01/93 DK  
(33) 442/93 20/04/93 DK  
(54) TITULO - LIPASA ALCALINA.  
(61) ADICIONAL A LA/S PATENTE/S NRO/S  
---- REVALIDA DE LA/S PATENTE/S NRO/S  
(71) TITULAR - NOVO NORDISK A/S  
---- CON RESIDENCIA EN NOVO ALLE, 2880 BAGSVAERD, DINAMARCA.  
---- PAIS DK  
(74) AGENTE - 0195